



Univerzitet u Beogradu
STOMATOLOŠKI FAKULTET
Dr Subotića 8, tel: 2685-288, e-mail: stomfak@rcub.bg.ac.rs



BR. 36/3A

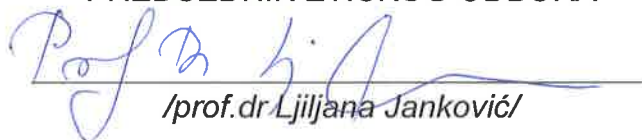
datum: 01.11.2016 Na molbu dr Milošu Lazareviću, Etički odbor
Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na sednici održanoj dana
01.11.2016.godine, daje

SAGLASNOST

dr Milošu Lazareviću za sprovođenje istraživanja u okviru izrade doktorske
disertacije, pod naslovom:

*“IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ČELIJA POREKLOM
OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA“*

PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA


/prof.dr Ljiljana Janković/

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

За кандидата: **Милош Лазаревић**

Име и презиме ментора: **Јелена Милашин**

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Brajić I., Škodrić S., Milenković S., Tepavčević Z., Soldatović I., Čolić S., **Milašin J.**, Andrić, M. Survivin, cyclin D1, and p21hras in keratocystic odontogenic tumors before and after decompression. Oral Dis. 2016, 22(3): 220-5.
2. Jelovac DB, Tepavčević Z, Nikolić N, Ilić B, Eljabo N, Popović B, Čarkić J, Konstantinović V, Vukadinović M, Miličić B, **Milašin J.** The amplification of c-erb-B2 in cancer-free surgical margins is a predictor of poor outcome in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 2016, 45(6): 700-5.
3. Carkic J, Nikolic N, Radojevic-Skodric SM, Kuzmanovic-Pficer J, Brajovic G, Antunovic M, **Milasin J**, Popovic B. The role of TERT-CLPTM1L SNPs, hTERT expression and telomere length in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. J Oral Sci. 2016, 58(4): 449-58.
4. Nikolic N, Anicic B, Carkic J, Simonovic J, Toljic B, Tanic N, Tepavcevic Z, Vukadinovic M, Konstantinovic VS, **Milasin J.** High frequency of p16 and p14 promoter hypermethylation and marked telomere instability in salivary gland tumors. Arch Oral Biol. 2015, 60(11):1662-6.
5. Kostic MM, Nikolic N, Ilic B, Jelovac DB, Trakilovic S, Bozovic M, **Milasin J.** Association of Tnf-R2 (676t > G) Single Nucleotide Polymorphism with Head and Neck Cancer Risk in the Serbian Population. Arch Oral Biol. 2013, 65(1): 387-93.
6. Tanic N, **Milasin J**, Dramicanin T, Boskovic M, Vukadinovic M, Milosevic V, Tanic NT. Tp53 and C-Myc Co-Alterations - a Hallmark of Oral Cancer Progression. J Med Bioch. 2013, 32(4): 380-8.

Датум 26.01.2017

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

ПОДАЦИ О КОМЕНТОРУ

За кандидата: **Милош Лазаревић**

Име и презиме коментора: **Милан Петровић**

Звање: доцент

Списак радова који квалификују коментора за вођење докторске дисертације:

1. Sjerobabin Nikola I Colovic Bozana M **Petrovic Milan** Markovic Dejan Zivkovic Slavoljub Jokanovic Vukoman R. Cytotoxicity investigation of a new hydroxyapatite scaffold with improved structural design. SRPSKI ARHIV ZA CELOKUPNO LEKARSTVO, (2016), vol. 144 br. 5-6, str. 280-287.
2. Mikovic Nikola Lazarevic Milos M Tatic Zoran V Krejovic-Trivic Sanja **Petrovic Milan** Trivic Aleksandar. Radiographic cephalometry analysis of condylar position after bimaxillary osteotomy in patients with mandibular prognathism. VOJNOSANITETSKI PREGLED, (2016), vol. 73 br. 4, str. 318-325
3. Jokanovic Vukoman R Colovic Bozana M Markovic Dejan **Petrovic Milan** Jokanovic Milan Milosavljevic P Sopta Jelena. In Vivo Investigation of ALBO-OS Scaffold Based on Hydroxyapatite and PLGA. JOURNAL OF NANOMATERIALS, (2016) Epub ahead of print.
4. Gavric Miodrag Antic Svetlana Jelovac Drago B Zarev Anita I **Petrovic Milan B** Golubovic Mileta Antunovic Marija. Osteonecrosis of the jaw as a serious adverse effect of bisphosphonate therapy and its indistinct etiopathogenesis. VOJNOSANITETSKI PREGLED, (2014), vol. 71 br. 8, str. 772-776.
5. Golubovic Mileta **Petrovic Milan B** Jelovac Drago B Nenezic Dragoslav U Antunovic Mirjana M. Malignant ameloblastoma metastasis to the neck - radiological and pathohistological dilemma. VOJNOSANITETSKI PREGLED, (2012), vol. 69 br. 5, str. 444-448.
6. Golubovic Mileta Asanin Bogdan Jelovac Drago B **Petrovic Milan B** Antunovic Marija. Correlation between disease progression and histopathologic criterions of the lip squamous cell carcinoma. VOJNOSANITETSKI PREGLED, (2010), vol. 67 br. 1, str. 19-24.

Датум 26.01.2017

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Curriculum Vitae

Lične informacije:

Ime i prezime: **Miloš Lazarević**

Datum rođenja: 31.08.1988

Lična adresa: Risanska 2, 11000, Beograd, Srbija

Broj mob. 064/490 126 8

E-mail: miloslaz88@gmail.com

Zvanje: Doktor stomatologije

Datum diplomiranja: 27.01.2013

Osnovnu i srednju medicinsku školu završio u Leskovcu sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom;

Juna 2007. upisao Stomatološki fakultet u Beogradu kao 4. rang listi;

Januara 2013. diplomirao na Stomatološkom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,69;

Od februara 2013. do februara 2014. obavio pripravnički staž na Stomatološkom fakultetu u Beogradu;

Marta 2014. položio državni ispit za doktora stomatologije u Beogradu;

Oktobra 2013. upisao doktorske studije na Stomatološkom fakultetu u Beogradu.

Uspešno završio prvu i drugu godinu doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10.

Učešća na projektima:

Od marta do novembra 2014. na projektu "Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije" (rukovodilac- prof. dr Jelena Milašin) kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja;

Stipendije:

2007- 2008 Studentska stipendija Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

2008-2012 Stipendija zadižbine Dragoljuba Marinkovića

2012-2013 Stipendija grada Beograda

2014 Stipendija Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (za doktorante)

Znanje stranih jezika:

Engleski jezik (nivo B2- FCE Cambridge certificate)

Nemački jezik (nivo B1)

Rezultati naučnoistraživačkog rada:

Rad u međunarodnom časopisu (M23):

- Mikovic N, **Lazarevic M**, Tatic Z, Trivic S, Petrovic M, Trivic A. Radiographic cephalometry analysis of condylar position after bimaxillary osteotomy in patients with mandibular prognathism. Vojnosanit Pregl 2015 Online First July (00): 51–51.

Saopštenja sa međunarodnih skupova:

- **Lazarevic M**. Biokompatibilnost Ag-Pd legura In vivo studija - prezentovan na 51. Kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem 2010.

- **Lazarevic M**. Stasic J. Klinički parametri direktne i Akinosi tehnike mandibularne anestezije - prezentovan na 52. Kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem 2011.

- **Lazarevic M**, Krezovic S. Da li profilaktička primena antibiotika utiče na učestalost komplikacija nakon hirurškog vađenja impaktiranih donjih umnjaka? - prezentovan na 53. Kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem 2012.

- Stasic J, **Lazarevic M**. Efekti lokalne primene deksametazona u terapiji alveolita- prezentovan na 53. Kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem 2012.

- **Lazarevic M**, Petrovic M. Uticaj zamrzavanja oralnog skvamocelularnog karcinoma na preživljavanja ćelija primarne kulture - poster prezentacija prezentovana povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2015.

- Simonovic J, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, **Lazarevic M**, Carkic J, Milasin J. Izolacija i karakterizacija matičnih ćelija iz apikalne papile impaktiranog umnjaka - poster prezentacija prezentovana povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2015.

- Trisic D, Toljic B, Milosevic M, Simonovic J, **Lazarevic M**, Popovic B, Markovic D, Milasin J. Cells from apical papilla differently express mesenchymal stem cell markers depending on patient's age and passage number - poster prezentacijana 11.Balkanskom kongresu humane genetike 2015.

- Simonovic J, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, **Lazarevic M**, Carkic J, Tredici G, Damante G, Milasin J; Neurogenic potential of stem cells from tooth apical papilla, GlowBrain Final Conference “Stem cell and biomaterial applications for brain repair”, Zagreb, Croatia. 2015.

OBRAZLOŽENJE TEME

IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA

Uvod

Maligni tumori glave i vrata imaju godišnju incidencu na svetskom nivou od približno 650 000 novih slučajeva, a u razvijenim zemljama godišnji mortalitet od ovog oboljenja iznosi 350 000 osoba (Argiris i sar.). U grupu tumora glave i vrata spadaju i maligni tumori usne duplje, od kojih većinu čine planocelularni karcinomi (OPK). Širom sveta raste incidenca i ovih maligniteta (Moore i sar.). Uprkos značajnim poboljšanjima u hirurškoj i radioterapiji, i kombinovanih modaliteta lečenja koji unapređuju kvalitet života pacijenata, procenat njihovog preživljavanja se neznatno poboljšao poslednjih 20 godina (Forastiere i sar.). Zbog toga se nameće pronalaženje novih pristupa u lečenju OPK a za to su neophodni što brojniji in vitro i in vivo modeli na kojima bi se izučavali različiti terapijskih modaliteti. Dobro je poznato da je OPK heterogena bolest (Mannelli i sar.) i da unutar tumora postoje ćelije koje se značajno međusobno razlikuju u pogledu potencijala proliferacije i potencijala za formiranja novih tumora (Wilson i sar.).

Skorašnja istraživanja upućuju na postojanje male populacije ćelija tzv. kancerskih matičnih ćelija (KMĆ) koje su odgovorne za inicijaciju, progresiju i metastaziranje tumora. KMĆ su najpre identifikovane, izolovane i karakterizovane kod leukemije (Huntly i Gilliland), zatim i kod drugih karcinoma- karcinoma mozga (Singh i sar.), kolorektalnog karcinoma (Yeung i sar.), karcinoma jajnika (Gao i sar.), karcinoma mokraćne bešike (Overdevest i sar.), karcinoma pankreasa (Li i sar.) kao i kod oralnog planocelularnog karcinoma (Wilson i sar.). Postoje različite metode njihove identifikacije i karakterizacije. Moguća je karakterizacija na osnovu funkcionalnih osobina kao što je stepen ekspresije Hoechst 33342 boje (Tabor i sar.) i aktivnost enzima ALDH (Chen i sar.), zatim na osnovu sposobnosti formiranja kolonija (Franken i sar.) kao i formiranja sfera na neadherentnim podlogama (Pastrana i sar.). Hemorezistentnost je takođe jedna od osobina KMĆ, pa je i na osnovu ove činjenice moguća njihova karakterizacija (Fabian i sar.).

Jedan od načina dokazivanja KMĆ je i preko prisustva markera matičnih ćelija koji su specifični za svaku vrstu karcinoma. Tu ubrajamo membranske proteine CD44 (Prince i sar.), CD133 (Prominin 1) (Wu i sar.), transkripcione faktore OCT4, Sox2, Nanog (Vaiphei i sar.), Bmi-1 (Liu i sar.), Klf4 (Moral i sar.), EpCAM (Maetzel i sar.), Snail, Twist i druge (Mani i sar., Albers i sar.). Međutim, nije do kraja razjašnjeno da li su markeri KMĆ tumor specifični za samo tkivo gde su nastali, ili za nišu u kome se tumor razvija (Alberts i sar.). Nema podataka o eventualnom postojanju razlike u markerima KMĆ između različitih lokacija unutar tumora (centar - periferija), kao što u literaturi nisu nađene studije koje su se bavile ovom vrstom istraživanja na ćelijama poreklom iz tumorskih margina. Iz tih razloga, ideja naše studije je da se izoluju i okarakterišu ćelije unutar samog tumora kao i ćelije tumorske margine koje su 3-5 mm udaljene od tumora.

Polazna hipoteza

Polazna hipoteza je da se (a) ćelije tumora i ćelije tumorskih margina razlikuju u pogledu bitnih bioloških karakteristika kao što su stepen diferencijacije, kapacitet proliferacije i migracije i dr., (b) da ove karakteristike i jednih i drugih ćelija utiču na ponašanje tumora.

Ciljevi:

1. Izolovanje i kultivisanje ćelija iz oralnog planocelularnog karcinoma i marginalnog tkiva,
2. Optimizacija uslova kultivisanja i propagiranja izolovanih ćelija,
3. Fenotipska identifikacija i karakterizacija ćelija,
4. Određivanje klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala izolovanih ćelija,
5. Utvrđivanje markera matičnosti kancerskih ćelija,
6. Određivanje stepena rezistentnosti/ senzitivnosti ćelija u kulturi prema citostaticima.

Materijal i metode

Istraživanje podrazumeva izolaciju ćelija iz oralnih planocelularnih karcinoma i bilo bi obavljeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Za istraživanje je potrebno **pet** oralnih planocelularnih karcinoma sa tkivom margine udaljenim 3-5 mm od ivice tumora.

Odmah nakon hirurške intervencije na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju, tkiva će se mehanički usitniti hiruškim skalpelom bez enzimske digestije. Usitnjeno tkivo će se inkubirati u osnovnom medijumu za kultivaciju na plastičnim pločama (površine $9,5\text{cm}^2$) ili u plastičnim bocama (površina 25cm^2) za kulturu tkiva, na temperature od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi sa 5% CO_2 i 100% vlažnosti vazduha.

U cilju dobijanja dovoljnog broja ćelija za dalje analize, ćelije će se kultivisati do subkonfluentnog stepena (70% konfluentnosti), a onda će se sukcesivnim ekspanzijama (pasažama) umnožavati, pri čemu bi broj ćelija dobijen nakon svake pasaže ukazao na potencijalno različit proliferativni kapacitet ćelija iz dve ispitivane grupe uzoraka (iz centralnog dela tumora i tkiva margine). Istovremeno, ispitivala bi se i uspešnost zamrzavanja, skladištenja, kao i oporavka ćelija nakon krioprezervacije.

Fenotipska identifikacija i karakterizacija karcinomskih ćelija i ćelija marginalnog tkiva prve i pete pasaže će se obaviti korišćenjem invertne mikroskopije, skening elektronske mikroskopije i raman spektromikroskopije. Na ovaj način će se utvrditi potencijalna razlika u morfologiji ćelija različite lokalizacije tkiva kao i različite pasaže.

U određivanju klonogenog potencijala izolovanih ćelija, koristiće se test formiranja kolonija (Colony Forming Unit) test, koji se zasniva na zasejavanju istog broja ćelija (po 200) za obe grupe ćelija, i praćenja proliferacije i formiranja kolonija nakon 7 i 14 dana, kada će se bojenjem sa $0,05\%$ crystal violet, jasno uočavati kolonije i njihov broj na invertnom mikroskopu. Broj kolonija analiziraće se u programu Image J, a dobijeni rezultati koristiti za statističku analizu. U cilju određivanja proliferativnog potencijala, radiće se test ćelijske proliferacije (Cell Proliferation Assay) koji podrazumeva zasejavanje istog broja ćelija (po 10 000) i brojanje ćelija nakon 1. 5. i 7. dana nakon zasejavanja. Migratorni potencijal ćelija će se određivati testom zarastanja rana (Scratch Wound Healing Assay) (Eder i sar.). Nakon zasejavanja ćelija (po 20 000) i uspostavljanja 80% konfluentnosti, sterilnom gumom širine 1mm ćelije se razdvajaju, a zatim prate tokom vremena 72h. Smanjivanje razdaljine između razdvojenih ćelija mikroskopski

se meri pomoću programa ScopeImage 9.0, a dobijeni rezultati će služiti za određivanje brzine ćelijske migracije i kasniju statističku analizu.

U cilju utvrđivanja prisustva osobina matičnosti kod ćelija karcinoma vršiće se testiranje kako pozitivne, tako i negativne ekspresije površinskih markera metodom protočne citometrije (Wilson i sar.), a za ova testiranja koristiće se ćelije dobijene nakon prve i pete pasaže. Za identifikaciju karcinomskih matičnih ćelija vršiće se imunofenotipizacija preko dokazivanja pozitivne ekspresije markera CD44, CD73 i CD90. Takođe, vršiće se i testiranje negativne ekspresije (odsustva) hematopoetskog markera CD34 (molekul prisutan u populaciji primitivnih hematopoetskih ćelija). Osim metode protočne citometrije, radiće se i izolacija RNK iz ćelija OPK i marginalnog tkiva prve i pete pasaže u cilju ispitivanja genske ekspresije markera matičnosti real-time qPCR-om (Yanamoto i sar.). Markeri koji će se ispitivati korišćenjem specifičnih prajmera su: Oct-4, SoX-2, CD44, CD133 i Nanog.

Sposobnost formiranja sferičnih oblika nakon zasejavanja na neadherentnoj podlozi, je takođe jedna od osobina matičnosti. Test formiranja sfera (Krishnamurthy i Nor) će se raditi na površini plastike koja je presvučena slojem 1% agaroze. Biće zasejano po 10000 ćelija OPK i marginalnog tkiva prve i pete pasaže. Pojava sfera i broj sfera će se proceniti mikroskopski, dok će prečnik sfera odrediti program ScopeImage 9.0.

Stepen rezistentnosti/ senzitivnosti ćelija određivaće se procenom stepena vijabilnosti ćelija nakon dejstva citostatika indirektnom metodom- MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipeniltetrazolium bromid) testom (Lim i sar.). Nakon 24 časovnog dejstva citostatika (5-Fluorouracila i Cisplatin), posmatrala bi se mitohondrijska aktivnost i broj živih ćelija.

Informacije za pacijenta/pristanak pacijenta

Pacijenti uključeni u ovu studiju bi bili sa potvrđenom dijagnozom oralnog planocelularnog karcinoma lokalizovanom na podu usne duplje ili jeziku kojima je indikovana hirurška intervencija u cilju njihovog lečenja. Učesnicima u studiji će biti objašnjeno da je njihovo učestvovanje na dobrovoljnoj bazi i da neće uticati na ishod i tok njihove terapije. Nakon dobijanja informacija o prirodi i ciljevima ove studije putem informatora za pacijente (u

prilogu), ispitanici će popunjavati formular koji se odnosi na Saglasnost za pristanak u studiji (u prilogu).

Statistička analiza

Statističkom analizom bili bi obuhvaćeni svi parametri dobijeni laboratorijskim ispitivanjima. Baza podataka bila bi formirana u statističkom paketu SPSS 18.0, gde bi bila vršena i dalja analiza prikupljenih podataka. Bili bi korišćeni testovi deskriptivne statistike za atributivna obeležja posmatranja. Numerička obeležja posmatranja bila bi analizirana parametarskim ili neparametarskim testovima, zavisno od normalnosti raspodele podataka.

Granična vrednost za prihvatanje radne hipoteze bila bi postavljena na $p < 0.05$.

Literatura

Alberts AE, ChenC, KoberleB, QianX, KlussmannJP, WollenbergB, KaufmannAM: Stem cells in squamous head and neck cancer. Critical reviews oncology/hematology 81: 224–240, 2012.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. Lancet 371: 1695-1709, 2008.

Chen YC, Chen YW, Hsu HS: Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. Biochem Biophys Res Commun 385: 307-313, 2009.

Eder K, Dietzel S, Harreus U, Mack B, Guhlich M, Eggert C et al: An intravital multiphoton microscopy model for visualization of tumor cell dissemination and lymphatic vasculature. Cancer research frontiers 1: 200-207, 2015.

Fábián, A, Barok M, Vereb G, Szöllosi, J.: Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? Cytometry A 75: 67–74, 2009.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. New England Journal Med 345:1890–1900, 2011.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C.: Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 1: 2315–2319, 2006.

Gao MQ, Choi YP, Kang S, Houn JH, Cho NH: CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. Oncogene 29: 2697–2780, 2010.

Huntly BJP, Gilliland DG: Leukaemiastem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *National Reviews* 5: 311–321, 2005.

Krishnamurthy S, Nor JE: Orosphere Assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head and neck* 35: hed.23076, 2013.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* 67: 1030–1037, 2007.

Lim YC, Oh SY, Cha YY, Kim S, Jin X, Kim H: Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 47: 83-91, 2011.

Liu W, Feng JQ, Shen XM: Two stem cell markers, ATP-binding cassette, G2 subfamily (ABCG2) and BMI-1, predict the transformation of oral leukoplakia to cancer: a long-term follow-up study. *Cancer* 118: 1693-1700, 2006.

Maetzel D, Denzel S, Mack B: Nuclear signaling by tumor- associated antigen EpCAM. *Nat. Cell Biol* 11: 162-171, 2009.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al.: The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715, 2008.

Mannelli G, Gallo O: Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treatment Reviews* 38:515–539, 2012.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF: The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Disease* 6: 65-74, 2000.

Moral M, Segrelles C, Belen A: Transgenic mice expressing constitutively active akt in oral epithelium validate Klf4 as a potential biomarker of head and neck squamous cell carcinoma. *In vivo* 23: 653-330, 2009.

Overdevest JB, Thomas S, Kristiansen G, Hansel DE, Smith SC, Theodorescu D: CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Research* 71: 3802–3811, 2011.

Pastrana, E, Silva-Vargas V, Doetsch F :Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 486–498, 2011.

Pozzi V, Satrini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S et al: Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck Squamous cell carcinoma cell lines. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36: 784-798, 2015.

Singh S, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T et al: Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 432: 396–401, 2004.

Tabor MH, Clay MR, Owen JH: Head and neck cancer stem cells: side population. *Laryngoscope* 121: 527-533, 2011.

Vaiphei K, Sinha SK, Kochhar R: Comparative analysis of Oct4 in different histological subtypes of esophageal squamous cell carcinomas in different clinical conditions. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 3519-3524, 2014.

Wilson GD, Marples B, Galoforo S, Geddes TJ, Thibodeau BJ, Grenman R et al: Isolation and genomic characterization of stem cells in head and neck cancer. *Head and neck* 35: 1573-1582, 2013.

Wu Y, Wu PY: CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 18: 1127-1134, 2009.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H et al: Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology* 47: 855-860, 2011.

Yeung TM, Gradhi SC, Wilding JL, MuschelR, Bodmer WF: Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *PNAS* 107: 3722–3727, 2009.

INFORMATOR ZA ISPITANIKE

Naslov istraživanja:

„IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA“

Plan i svrha istraživanja

Studija se bavi istraživanjem karcinomskih ćelija koje se izoluju iz tumora usne šupljine. Tumorske ćelije su oduvek bile interesantne u medicini i stomatologiji u cilju istraživanja njihovih osobina, dok su ćelije na periferiji tumora još uvek nedovoljno ispitivane.

Cilj ovog istraživanja biće ispitivanje osobina i razlika između ćelija unutar samog tumora i ćelija koje se nalaze na njegovoj periferiji.

Istraživanje će biti sprovedeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u okviru izrade doktorske disertacije.

Za učešće u studiji ne postoji novčana naknada.

Ne postoji sukob interesa od strane istraživača uključenih u studiju.

Nakon potpisivanja **Saglasnosti**, uzimanja istorije bolesti i standardne hiruške procedure, mali deo izvađenog tumora i njegove periferije će biti transportovan u odgovarajućem medijumu u laboratoriju Stomatološkog fakulteta radi daljeg istraživanja.

Rizici po pacijenta

U literaturi ne postoje podaci o postojanju rizika u vezi sa ovakvim procedurama.

Značaj istraživanja

Moguća korist ove studije odnosi se na razumevanje ponašanja tumorskih ćelija i njenu eventualnu primenu u daljim istraživanjima terapije karcinoma.

Tajnost podataka

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Uvid u medicinsku dokumentaciju, osim ordinirajućeg lekara, imaće samo članovi istraživačkog tima, a za objavljivanje će biti korišćeni isključivo anonimni studijski podaci.

Pacijent će blagovremeno biti obavešten ako nove informacije postanu dostupne

Pacijent će na vreme biti obavešten ako dođe do bilo kakvih promena u istraživanju ili ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne. Sve informacije će moći da dobije od članova istraživačkog tima.

Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz studije

Učestvovanje u studiji je potpuno dobrovoljno. Povlačenje iz studije je moguće u svakom trenutku iz bilo kog razloga, i neće imati uticaja na način i ishod terapije pacijenta.

Približan broj učesnika u studiji

Približan broj učesnika u studiji će biti: 5 pacijenata.

Koga pitati

Ukoliko u bilo kom trenutku poželite više informacija o ovom istraživanju, molimo Vas da se obratite dr Milošu Lazareviću, sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu (064/4901268).

Naslov studije:

**„IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ČELIJA
POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA“**

SAGLASNOST

Nakon što sam pročitao/la **Informator za pacijente** gde je opisan postupak i izvođenje istraživanja, informisan/a sam o prirodi i ciljevima ove studije kao i o potencijalnim rizicima i koristima. Imao/la sam priliku da postavim pitanja u vezi sa studijom i dobio/la zadovoljavajuće odgovore.

Razumem da je moje učešće

(Ime i prezime)

potpuno dobrovoljno i da sam slobodan/na da povučem svoj pristanak u bilo kom trenutku bez davanja bilo kakvih razloga, što neće uticati na način i ishod terapije.

Svaka informacija u vezi sa mnom biće poverljiva, a samo će anonimni studijski podaci biti korišćeni za objavljivanje.

Slažem se da informacije u vezi samnom mogu biti poslate u druge zemlje, unutar i izvan Evropske unije.

Dobrovoljno dajem pristanak za učešće ikorišćenju ćelija koje se izoluju iz tumora i perifernog tkiva tumora uistraživanju navedenom u okviru **Informatora za pacijente**.

Ime i prezime ispitanika _____

(štampanim slovima)

Potpis ispitanika _____

Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Nastavno- naučno veće Stomatološkog fakulteta u Beogradu na sednici održanoj 22.11.2016. godine, a na osnovu člana 50. Statuta Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, donelo je odluku o imenovanju komisije za ocenu predloga teme doktorske disertacije dr Miloša Lazarevića, pod naslovom „**IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA**“.

Komisija u sastavu:

- dr Jelena Milašin, redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,
- dr Vesna Danilović, redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,
- dr Milan Petrović, docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
- dr Pavle Andus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

na osnovu pregleda priložene dokumentacije, podnosi sledeći

IZVEŠTAJ KOMISIJE

A. Osnovni podaci o kandidatu

Kandidat dr Miloš Lazarević je rođen 31.08.1988. godine u Leskovcu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2007. godine i diplomirao u januaru 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,69. Tokom studiranja bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije, zadužbine “Dragoljub Marinković” i grada Beograda. Pripravnički staž obavio je na istom fakultetu, a državni ispit položio 2014. godine. Doktorske studije upisao je u oktobru 2013. godine. Bio je angažovan kao stipendista na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175075 “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”.

B. Bibliografija kandidata

Radovi u međunarodnom časopisu:

Miković N, **Lazarević M**, Tatić Z, Trivić S, Petrović M, Trivić A. Radiographic cephalometry analysis of condylar position after bimaxillary osteotomy in patients with mandibular prognathism. Vojnosanit Pregl (2016), 73 (4), 318-325 (M23)

Saopštenja sa naučnih skupova štampana u izvodu:

Lazarević M, Petrović M. Uticaj zamrzavanja oralnog skvamocelularnog karcinoma na preživljavanje ćelija primarne kulture - poster prezentacija prezentovana povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2015 (M64)

Simonovic J, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, **Lazarevic M**, Carkic J, Milasin J. Izolacija i karakterizacija matičnih ćelija iz apikalne papile impaktiranog umnjaka - poster prezentacija prezentovana povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2015 (M64)

Trisic D, Toljic B, Milosevic M, Simonovic J, **Lazarevic M**, Popovic B, Markovic D, Milasin J. Cells from apical papilla differently express mesenchymal stem cell markers depending on patient's age and passage number. 11th Balkan Congress of Human Genetics, Kladovo, 2015 (M34)

Simonovic J, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, **Lazarevic M**, Carkic J, Tredici G, Damante G, Milasin J; Neurogenic potential of stem cells from tooth apical papilla, GlowBrain Final Conference "Stem cell and biomaterial applications for brain repair", Zagreb, Croatia. 2015 (M 34)

C. Obrazloženje teme

Uvod

Maligni tumori glave i vrata imaju godišnju incidencu na svetskom nivou od približno 650 000 novih slučajeva, a u razvijenim zemljama godišnji mortalitet od ovog oboljenja iznosi 350 000 osoba (Argiris i sar.). U grupu tumora glave i vrata spadaju i maligni tumori usne duplje, od kojih većinu čine planocelularni karcinomi (OPK). Širom sveta raste incidenca i ovih maligniteta (Moore i sar.). Uprkos značajnim poboljšanjima u hirurškoj i radioterapiji, i kombinovanih modaliteta lečenja koji unapređuju kvalitet života pacijenata, procenat njihovog preživljavanja se neznatno poboljšao poslednjih 20 godina (Forastiere i sar.). Zbog toga se nameće pronalaženje novih pristupa u lečenju OPK a za to su neophodni što brojniji in vitro i in vivo modeli na kojima bi se izučavali različiti terapijskih modaliteti. Dobro je poznato da je OPK heterogena bolest (Mannelli i sar.) i da unutar tumora postoje ćelije koje se značajno međusobno razlikuju u pogledu potencijala proliferacije i potencijala za formiranja novih tumora (Wilson i sar.).

Skorašnja istraživanja upućuju na postojanje male populacije ćelija tzv. kancerskih matičnih ćelija (KMC) koje su odgovorne za inicijaciju, progresiju i metastaziranje tumora. KMC su najpre identifikovane, izolovane i karakterizovane kod leukemije (Huntly i Gilliland), zatim i kod drugih karcinoma- karcinoma mozga (Singh i sar.), kolorektalnog karcinoma (Yeung i sar.), karcinoma jajnika (Gao i sar.), karcinoma mokraćne bešike (Overdevest i sar.), karcinoma pankreasa (Li i sar.) kao i kod oralnog planocelularnog karcinoma (Wilson i sar.). Postoje različite metode njihove identifikacije i karakterizacije. Moguća je karakterizacija na osnovu funkcionalnih osobina kao što je stepen ekspresije Hoechst 33342 boje (Tabor i sar.) i aktivnost enzima ALDH (Chen i sar.), zatim na osnovu sposobnosti formiranja kolonija (Franken i sar.) kao i formiranja sfera na neadherentnim podlogama (Pastrana i sar.).

Hemorezistentnost je takođe jedna od osobina KMĆ, pa je i na osnovu ove činjenice moguća njihova karakterizacija (Fabian i sar). Jedan od načina dokazivanja KMĆ je i preko prisustva markera matičnih ćelija koji su specifični za svaku vrstu karcinoma. Tu ubrajamo membranske proteine CD44 (Prince i sar.), CD133 (Prominin 1) (Wu i sar.), transkripcione faktore OCT4, Sox2, Nanog (Vaiphei i sar.), Bmi-1 (Liu i sar.), Klf4 (Moral i sar.), EpCAM (Maetzel i sar.), Snail, Twist i druge (Mani i sar., Albers i sar). Međutim, nije do kraja razjašnjeno da li su markeri KMĆ tumor specifični za samo tkivo gde su nastali, ili za nišu u kome se tumor razvija (Alberts i sar.). Nema podataka o eventualnom postojanju razlike u markerima KMĆ između različitih lokacija unutar tumora (centar - periferija), kao što u literaturi nisu nađene studije koje su se bavile ovom vrstom istraživanja na ćelijama poreklom iz tumorskih margina. Iz tih razloga, ideja naše studije je da se izoluju i okarakterišu ćelije unutar samog tumora kao i ćelije tumorske margine koje su 3-5 mm udaljene od tumora.

Polazna hipoteza

Polazna hipoteza je da se (a) subpopulacije ćelija tumora i tumorskih margina razlikuju u pogledu bitnih bioloških karakteristika kao što su kapacitet proliferacije, diferencijacije i migracije i dr., (b) da ove karakteristike i jednih i drugih ćelija utiču na ponašanje tumora.

Ciljevi:

1. Izolovanje i kultivisanje ćelija iz oralnog planocelularnog karcinoma i marginalnog tkiva,
2. Optimizacija uslova kultivisanja i propagiranja izolovanih ćelija,
3. Fenotipska identifikacija i karakterizacija ćelija,
4. Određivanje klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala izolovanih ćelija,
5. Utvrđivanje markera matičnosti kancerskih ćelija,
6. Određivanje stepena rezistentnosti/ senzitivnosti ćelija u kulturi prema citostaticima.

Materijal i metode

Istraživanje podrazumeva izolaciju ćelija iz oralnih planocelularnih karcinoma ili bilo bi obavljeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Za istraživanje je potrebno pet oralnih planocelularnih karcinoma sa tkivom margine udaljenim 3-5 mm od ivice tumora.

Odmah nakon hirurške intervencije na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju, tkiva će se mehanički usitniti hiruškim skalpelom bez enzimske digestije. Usitnjeno tkivo će se inkubirati u osnovnom medijumu za kultivaciju na plastičnim pločama (površine 9,5cm²) ili u plastičnim bocama (površina 25 cm²) za kulturu tkiva, na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha.

U cilju dobijanja dovoljnog broja ćelija za dalje analize, ćelije će se kultivisati do subkonfluentnog stepena (70% konfluentnosti), a onda će se sukcesivnim ekspanzijama (pasažama) umnožavati, pri čemu bi broj ćelija dobijen nakon svake pasaže ukazao na

potencijalno različit proliferativni kapacitet ćelija iz dve ispitivane grupe uzoraka (iz centralnog dela tumora i tkiva margine). Istovremeno, ispitivala bi se i uspešnost zamrzavanja, skladištenja, kao i oporavka ćelija nakon krioprezervacije.

Fenotipska identifikacija i karakterizacija karcinomskih ćelija i ćelija marginalnog tkiva prve i pete pasaže će se obaviti korišćenjem invertne mikroskopije, skening elektronske mikroskopije i raman spektromikroskopije. Na ovaj način će se utvrditi potencijalna razlika u morfologiji ćelija različite lokalizacije tkiva kao i različite pasaže.

U određivanju klonogenog potencijala izolovanih ćelija, koristiće se test formiranja kolonija (Colony Forming Unit) test, koji se zasniva na zasejavanju istog broja ćelija (po 200) za obe grupe ćelija, i praćenja proliferacije i formiranja kolonija nakon 7 i 14 dana, kada će se bojenjem sa 0,05% crystal violet, jasno uočavati kolonije i njihov broj na invertnom mikroskopu. Broj kolonija analiziraće se u programu Image J, a dobijeni rezultati koristiti za statističku analizu. U cilju određivanja proliferativnog potencijala, radiće se test ćelijske proliferacije (Cell Proliferation Assay) koji podrazumeva zasejavanje istog broja ćelija (po 10 000) i brojanje ćelija nakon 1. 5. i 7. dana nakon zasejavanja. Migratorni potencijal ćelija će se određivati testom zarastanja rana (Scratch Wound Healing Assay) (Eder i sar.). Nakon zasejavanja ćelija (po 20 000) i uspostavljanja 80% konfluentnosti, sterilnom gumom širine 1mm ćelije se razdvajaju, a zatim prate tokom vremena 72h. Smanjivanje razdaljine između razdvojenih ćelija mikroskopski se meri pomoću programa ScopeImage 9.0, a dobijeni rezultati će služiti za određivanje brzine ćelijske migracije i kasniju statističku analizu.

U cilju utvrđivanja prisustva osobina matičnosti kod ćelija karcinoma vršiće se testiranje kako pozitivne, tako i negativne ekspresije površinskih markera metodom protočne citometrije (Wilson i sar.), a za ova testiranja koristiće se ćelije dobijene nakon prve i pete pasaže. Za identifikaciju karcinomskih matičnih ćelija vršiće se imunofenotipizacija preko dokazivanja pozitivne ekspresije markera CD44, CD73 i CD90. Takođe, vršiće se i testiranje negativne ekspresije (odsustva) hematopoetskog markera CD34 (molekul prisutan u populaciji primitivnih hematopoetskih ćelija). Osim metode protočne citometrije, radiće se i izolacija RNK iz ćelija OPK i marginalnog tkiva prve i pete pasaže u cilju ispitivanja genske ekspresije markera matičnosti real-time qPCR-om (Yanamoto i sar.). Marker koji će se ispitivati korišćenjem specifičnih prajmera su: Oct-4, SoX-2, CD44, CD133 i Nanog.

Sposobnost formiranja sferičnih oblika nakon zasejavanja na neadherentnoj podlozi, je takođe jedna od osobina matičnosti. Test formiranja sfera (Krishnamurthy i Nor) će se raditi na površini plastike koja je presvučena slojem 1% agaroze. Biće zasejano po 10000 ćelija OPK i marginalnog tkiva prve i pete pasaže. Pojava sfera i broj sfera će se proceniti mikroskopski, dok će prečnik sfera odrediti program ScopeImage 9.0.

Stepen rezistentnosti/ senzitivnosti ćelija određivaće se procenom stepena vijabilnosti ćelija nakon dejstva citostatika indirektnom metodom- MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipeniltetrazolium bromid) testom (Lim i sar.). Nakon 24 časovnog dejstva citostatika (5-Fluorouracila i Cisplatin), posmatrala bi se mitohondrijska aktivnost i broj živih ćelija.

Statistička analiza

Statističkom analizom bili bi obuhvaćeni svi parametri dobijeni laboratorijskim ispitivanjima. Baza podataka bila bi formirana u statističkom paketu SPSS 18.0, gde bi bila vršena i dalja analiza prikupljenih podataka. Bili bi korišćeni testovi deskriptivne statistike za atributivna obeležja posmatranja. Numerička obeležja posmatranja bila bi analizirana parametarskim ili neparametarskim testovima, zavisno od normalnosti raspodele podataka.

Granična vrednost za prihvatanje radne hipoteze bila bi postavljena na $p < 0.05$.

Literatura

AlbertsAE, ChenC, KoberleB, QianX, KlussmannJP, WollenbergB, KaufmannAM: Stemcellsinsquamoushead and neck cancer. Critical reviews oncology/hematology 81: 224–240, 2012.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. Lancet 371: 1695-1709, 2008.

Chen YC, Chen YW, Hsu HS: Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. BiochemBiophys Res Commun 385: 307-313, 2009.

Eder K, Dietzel S, Harreus U, Mack B, Guhlich M, Eggert C et al: An intravitalmultiphoton microscopy model for visualization of tumor cell dissemination and lymphatic vasculature. Cancer research frontiers 1: 200-207, 2015.

Fábián, A, Barok M, Vereb G, Szöllosi, J.: Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? Cytometry A 75: 67–74, 2009.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. New England Journal Med 345:1890–1900, 2011.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C.: Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 1: 2315–2319, 2006.

Gao MQ, Choi YP, Kang S, Houn JH, Cho NH: CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. Oncogene 29: 2697–2780, 2010.

Huntly BJP, Gilliland DG: Leukaemiastem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. National Reviews 5: 311–321, 2005.

Krishnamurthy S, Nor JE: Oroshere Assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. Head and neck 35: hed.23076, 2013.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM: Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Research 67: 1030–1037, 2007.

Lim YC, Oh SY, Cha YY, Kim S, Jin X, Kim H: Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. Oral oncology 47: 83-91, 2011.

Liu W, Feng JQ, Shen XM: Two stem cell markers, ATP-binding cassette, G2 subfamily (ABCG2) and BMI-1, predict the transformation of oral leukoplakia to cancer: a long-term follow-up study. Cancer 118: 1693-1700, 2006.

Maetzel D, Denzel S, Mack B: Nuclear signaling by tumor- associated antigen EpCAM. Nat. Cell Biol 11: 162-171, 2009.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al.: The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715, 2008.

Mannelli G, Gallo O: Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treatment Reviews* 38:515–539, 2012.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF: The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Disease* 6: 65-74, 2000.

Moral M, Segrelles C, Belen A: Transgenic mice expressing constitutively active akt in oral epithelium validate Klf4 as a potential biomarker of head and neck squamous cell carcinoma. *In vivo* 23: 653-330, 2009.

Overdevest JB, Thomas S, Kristiansen G, Hansel DE, Smith SC, Theodorescu D: CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Research* 71: 3802–3811, 2011.

Pastrana, E, Silva-Vargas V, Doetsch F: Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 486–498, 2011.

Pozzi V, Satrini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S et al: Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck Squamous cell carcinoma cell lines. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36: 784-798, 2015.

Singh S, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T et al: Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 432: 396–401, 2004.

Tabor MH, Clay MR, Owen JH: Head and neck cancer stem cells: side population. *Laryngoscope* 121: 527-533, 2011.

Vaiphei K, Sinha SK, Kochhar R: Comparative analysis of Oct4 in different histological subtypes of esophageal squamous cell carcinomas in different clinical conditions. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 3519-3524, 2014.

Wilson GD, Marples B, Galoforo S, Geddes TJ, Thibodeau BJ, Grenman R et al: Isolation and genomic characterization of stem cells in head and neck cancer. *Head and neck* 35: 1573-1582, 2013.

Wu Y, Wu PY: CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 18: 1127-1134, 2009.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H et al: Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology* 47: 855-860, 2011.

Yeung TM, Gradhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF: Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *PNAS* 107: 3722–3727, 2009.

Zaključak

Na osnovu uvida u rad kandidata, priloženu dokumentaciju i biografiju kandidata zaključujemo da dr Miloš Lazarević ispunjava sve uslove za odobrenje teme za izradu doktorske disertacije u skladu sa važećim propisima Zakona o Univerzitetu i Satutom Univerziteta u Beogradu. Predložena tema je aktuelna, nedovoljno istražena i zanimljiva kako sa naučnog stanovišta, tako i sa stanovišta moguće primene u kliničkoj praksi.

Kandidat dr Miloš Lazarević je nakon opsežnog i detaljnog pregleda naučne literature, pokazao sposobnost da jasno definiše naučni problem i ciljeve istraživanja, te da vlada dizajnom istraživanja i izborom metodologije naučno-istraživačkog rada. Postavljeni ciljevi istraživanja kao i radna hipoteza su definisani u skladu sa predloženom temom. Navedene metode istraživanja predstavljaju savremene i pouzdane tehnike istraživanja pomoću kojih je moguće dobiti značajne rezultate u oblasti istraživanja planocelularnih karcinoma.

Na osnovu svega iznetog Komisija predlaže Nastavno-naučnom Veću Stomatološkog fakulteta u Beogradu da prihvati i odobri temu dr Miloša Lazarevića pod nazivom „IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA „MATIČNOSTI“ ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA“ i pokrene dalji postupak izrade doktorske disertacije.

Predlog mentora doktorske disertacije:

Za mentore se predlažu prof. dr Jelena Milašin i doc. dr Milan Petrović.

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Jelena Milašin

Prof. dr Vesna Danilović

Doc. dr Milan Petrović

Prof. dr Pavle Andus

U Beogradu, 14.12.2016.

Na osnovu člana 50. Statuta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Nastavno naučno veće Stomatološkog fakulteta, na III redovnoj sednici u školskoj 2016/17. godini, održanoj 28.02.2017. godine, donelo je sledeću

O D L U K U

Usvaja se pozitivan izveštaj stručne komisije za ocenu predloga teme doktorske disertacije **dr Miloša Lazarevića** pod nazivom **In-vitro ispitivanje karakteristika „matičnosti“ ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma.**

Utvrđuje se da kandidat može pristupiti radu na doktorskoj disertaciji pod navedenim nazivom, pod uslovom da se sa izveštajem komisije i odlukom ovog Veća saglasi Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Za mentora kandidatu imenuje se prof. dr Jelena Milašin, a za komentora doc. dr Milan Petrović.

Odluku dostaviti:

- Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu
- Imenovanom/oj,
- Mentoru,
- Komentoru,
- Veću,
- Odseku za nastavu,
- Pisarnici.

Referent kadrovskog odseka
Violeta Rastović

Dekan
Stomatološkog fakulteta

Prof.dr Miroslav Vukadinović

Fakultet STOMATOLOŠKI

Broj zahteva _____

članu 6. i članu 7. stav 1. ovog pravilnika)

(Datum)

Beograd,

UNIVERZITET U BEOGRADU

STRUČNO VEĆE ZA MEDICINSKE

NAUKE

(Naziv stručnog veća kome se zahtev upućuje, aglasno

Studentski trg br.1

ZAHTEV

za davanje saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije

Molimo da, shodno članu 57. st.3. Zakona o univerzitetu ("Službeni glasnik RS" br. 21/02), date saglasnost Na predlog teme doktorske disertacije:

„IN – VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA”MATIČNOSTI” ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA “

NAUČNA OBLAST

KLINIČKE STOMATOLOŠKE NAUKE

PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog od roditelja i prezime kandidata:

MILOŠ MILAN LAZAREVIĆ

2. Naziv i sedište fakulteta na kome je stekao visoko obrazovanje:

STOMATOLOŠKI FAKULTET U BEOGRADU

3. Godina diplomiranja:

2013

4. Naziv magistarske teze kandidata:

/

5. Naziv fakulteta na kome je magistarska teza odbranjena:

/

6. Godina odbrane magistarske teze:

7. Naziv fakulteta na kome je kandidat završio doktorske studije:

/

odsek, smer ili grupa

/

Godina završetka doktorskih studija:

/

Obaveštavamo vas da je

Nastavno naučno veće

(naziv nadležnog tela fakulteta)

na sednici održanoj

28.02.2017.

doktorske disertacije.

razmotrilo predloženu temu i zaključilo da je tema podobna za izradu

DEKAN FAKULTETA

Prof. dr Miroslav Vukadinović

Prilog:

1. Predlog teme doktorske disertacije sa obrazloženjem,
2. Akt nadležnog tela fakulteta o podobnosti teme za izradu doktorske disertacije.